



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>5</sup> :</b> <b>A61L 27/00, C12N 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/20151</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 15. September 1994 (15.09.94)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE94/00235 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 3. März 1994 (03.03.94)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 43 06 661.5      3. März 1993 (03.03.93)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> SITTINGER, Michael [DE/DE]; Apartment 160, St. Johann 6, D-91056 Erlangen (DE). BUJÍA, Jesús [ES/DE]; Dreyerstrasse 6, D-80689 München (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> HAFT, Uwe, M. usw.; Hans-Sachs-Strasse 5, D-80469 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen.</i>
<b>(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING AN IMPLANT FROM CELL CULTURES</b> <b>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM HERSTELLEN EINES IMPLANTATES AUS ZELLKULTUREN</b> <b>(57) Abstract</b> <p>The process attempts to produce especially cartilage cells in vitro. The cells are placed in a three-dimensional supporting structure, preferably of a polymer nonwoven, with the shape of the supporting structure corresponding to that of the implant to be obtained. The supporting structure is then perfused with a nourishing solution for a long period so that the intercellular matrix bonding the cells together can form at least partially within the supporting structure. The supporting structure with the at least partially formed intercellular matrix is then implanted. On the subsequent resorption of the supporting structure, the shape of the implant is preserved thanks to the intercellular matrix then formed.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Mit dem Verfahren wird angestrebt, insbesondere Knorpelzellen in vitro herzustellen. Die Zellen werden hierbei in einer dreidimensionalen Trägerstruktur, vorzugsweise aus einem Polymervlies eingelagert, wobei die Form der Trägerstruktur der Form des späteren Implantates entspricht. Die Trägerstruktur wird anschließend mit einer Nährlösung über eine lange Zeit perfundiert, wodurch sich innerhalb der Trägerstruktur die interzelluläre Matrix, die die Zellen aneinanderbindet, zumindest teilweise ausbilden kann. Die Trägerstruktur mit der zumindest teilweise ausgebildeten interzellulären Matrix wird dann implantiert. Bei der anschließenden Resorption der Trägerstruktur bleibt die Form des Implantates durch die dann ausgebildete interzelluläre Matrix erhalten.</p>		
<b>BEST AVAILABLE COPY</b>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Verinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere eines Implantates mit Knorpelzellen, wobei diese Zellen auf eine resorbierbare Trägerstruktur aufgebracht und anschließend implantiert werden.

Soll entferntes körpereigenes Gewebe, z.B. Knorpelgewebe ersetzt werden, so ist man bisher auf im wesentlichen zwei Möglichkeiten angewiesen:

1. Das benötigte Gewebe kann Leichen entnommen, konserviert und dann implantiert werden. Hierbei treten in einigen Fällen Immunreaktionen auf.
2. Zum Ersatz des entfernten Gewebes kann Eigengewebe verwendet werden, das dem Patienten an anderer, nach außen nicht sichtbarer Stelle entnommen und an dem Ort des entfernten Gewebes implantiert wird. Hier sind keine Immunreaktionen zu befürchten.

Ein entscheidender Nachteil dieser beiden Verfahren liegt jedoch darin, daß wegen der immer größeren Anzahl von Implantationen insgesamt zu wenig Material vorhanden ist, so daß der gewünschte Ersatz des Gewebes häufig nur unvollständig erfolgt.

Man hat daher ein drittes Verfahren vorgeschlagen, nämlich auf einem Polymerfaserbündel aus resorbierbarem Material in herkömmlicher Weise isolierte und vermehrte Zellen

aufzubringen und die Bündel zu implantieren; vgl. C.A. Vacanti et al., Plastic and Reconstructive Surgery, Vol. 8, No. 5, Nov. 1991, S. 753-759. Durch Übereinander- und Nebeneinanderschichtung der Bündel könnte das Implantat quasi dreidimensional modelliert werden. Nach der Implantation wird das Polymermaterial resorbiert, wobei gleichzeitig zwischen den einzelnen Zellen die interzelluläre Matrix aus insbesondere Kollagen aufgebaut werden soll, so daß sich im Endstadium eine in das umliegende Gewebe integrierte und voll funktionsfähige Gewebestruktur ergibt.

Dieses Verfahren ist noch im Versuchsstadium, an Tieren erprobt, jedoch in der Humanmedizin noch nicht angewendet.

Schwierigkeiten dürften sich bei diesem Verfahren bei der Modellierung des gewünschten Implantates ergeben, da eine Formstabilität der übereinander und nebeneinander gelegten Faserbündel während der Resorption des Fasermaterials nicht zu erwarten ist. Außerdem würden sich bei größeren Implantaten Schwierigkeiten mit der Ernährung der einzelnen Zellen ergeben, die im Inneren des Implantates gelegen sind.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit der Zellgewebe, insbesondere Knorpelgewebe, in einer für die Implantation günstigen Konfiguration zur Verfügung gestellt wird. Insbesondere soll das Implantat eine gute Formbarkeit und Formerhaltung im implantierten Zustand aufweisen und die Ernährung der einzelnen Zellen im Implantat sicher gewährleisten.

Diese Aufgabe ist gemäß der Erfindung durch die im Patentanspruch 1 angegebenen kennzeichnenden Merkmale gelöst.

Die grundlegende Idee der Erfindung besteht demnach darin, eine dreidimensionale formstabile Trägerstruktur mit der gewünschten Implantationsform aus einem Material mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen

Volumen, z.B. einem Polymervlies, vorzuformen, in den inneren Hohlraum der Trägerstruktur Zellen einzubringen und die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einer Nährlösung zu durchströmen. Sobald sich dann die interzelluläre Matrix zumindest teilweise ausgebildet hat, kann die gesamte dreidimensionale Trägerstruktur implantiert werden.

Durch die dreidimensionale Trägerstruktur wird sichergestellt, daß auch während der Resorption die Zellen mit ihrer interzellulären Matrix formstabil bleiben und die gewünschte Form des Implantats auch nach der Implantation beibehalten wird.

Durch die Perfusion wird sichergestellt, daß auch die innerhalb der Trägerstruktur gelegenen Zellen ausreichend mit Nährlösung versorgt werden und daß diese Versorgung aufrechterhalten bleibt, wenn sich die interzelluläre Matrix zumindest teilweise aufgebaut hat. Durch den Aufbau der Trägerstruktur und gegebenenfalls eine entsprechende Präparation erfolgt der Eintritt der Nährlösung in die Trägerstruktur und deren Durchdringung im wesentlichen nur durch Diffusion, was im übrigen auch der Situation in vivo entspricht. Die Ernährung der in der Trägerstruktur aufgenommenen Zellen durch Diffusion kann im übrigen noch dadurch sichergestellt werden, daß die gesamte Trägerstruktur mit einem Material ummantelt wird, das im wesentlichen nur eine Diffusion zuläßt. Ein solches Material ist z.B. Agarose.

Durch die Ernährung der Zellen in der Trägerstruktur über die Diffusion wird verhindert, daß die Zellenprodukte, insbesondere die für den Aufbau der interzellulären Matrix notwendigen Kollagene und Proteoglycane aus dem Zellverband ausgeschwemmt werden. Das Zurückhalten dieser notwendigen Faktoren, d.h. deren Retention kann noch dadurch verbessert und unterstützt werden, wenn die Perfusion der Trägerstrukturen mit der Nährlösung intervallartig erfolgt. In den Perfusionspausen werden dann die Zellprodukte am Ort

gehalten und bilden die Verbindungen mit den Zellen, wohingegen in den Perfusionsphasen auch unerwünschte Zellprodukte aus der Trägerstruktur und der Matrix ausgeschwemmt werden können.

Weitere Ausgestaltungen der Erfindung gehen aus den Unteransprüchen hervor.

Die Erfindung ist in einem Ausführungsbeispiel anhand der Figur näher erläutert, in der das Verfahren hinsichtlich der verwendeten Geräte schematisch dargestellt ist.

In der Beschreibung wird nur auf die Herstellung von Knorpelgewebe in vitro Bezug genommen; es ist jedoch selbstverständlich, daß hier auch andere Zellgewebe entsprechend behandelt werden können.

Für eine Implantation werden patienteneigene Knorpelzellen in herkömmlicher Weise auf einem Kulturmedium vermehrt.

Aus einem resorbierbaren formstabilen Polymerfaservlies wird eine Trägerstruktur hergestellt, deren Form dem späteren Implantat entspricht. Geeignete Vliesmaterialien sind z.B. Polyglykole oder Polylactide. Hieraus lassen sich Vliese herstellen, die eine große innere zusammenhängende Oberfläche bei gleichzeitig minimalem Materialvolumen aufweisen. Die zusammenhängende innere Oberfläche der Trägerstruktur wird mit einem Adhäsionsfaktor, z.B. Poly-L-Lysin beschichtet bzw. benetzt. Diese Benetzung erfolgt z.B. durch Eintauchen der Trägerstruktur in eine Polylysinlösung und anschließende Lyophilisation, d.h. Gefriertrocknung, so daß der Adhäsionsfaktor im wesentlichen die gesamte innere Oberfläche der Trägerstruktur bedeckt.

Wenn in der oben erwähnten Zellkultur eine ausreichende Anzahl von Zellen vorliegt, werden diese in der Suspension mit dem Kulturmedium in die dreidimensionale entsprechend

präparierte Trägerstruktur gefüllt. Zur Erhöhung der Viskosität der Suspension kann dieser noch ein resorbierbarer, die Viskosität erhöhender Stoff, z.B. die erwähnte Agarose zugesetzt werden.

Die die Zelle aufnehmende Trägerstruktur wird anschließend mit Agarose ummantelt, indem z.B. die Trägerstruktur in eine 2%ige Agaroselösung eingetaucht wird. Anschließend wird die Trägerstruktur einem Kälteschock unterworfen, z.B. durch Eintauchen in ein kaltes Wasserbad von etwa 4°C, wobei sich die Agarose des Mantels und ebenso die gegebenenfalls die der Suspension zugefügte Agarose verfestigt. Eine derartige Maßnahme erleichtert die folgende Handhabung.

Diese derart präparierte Trägerstruktur ist in der Figur mit 1 bezeichnet und wird in eine Perfusionsapparatur 2 eingesetzt. Diese Apparatur 2 besteht aus einem Gehäuse 3, in dem eine Perfusionskammer 4 vorgesehen ist, in die die Trägerstruktur eingesetzt wird. In das Gehäuse 3 mündet eine Zuführleitung 5 für eine Nährlösung, die zunächst in eine Mischkammer 6 eintritt, in der die Strömung vergleichmäßigt wird, bevor sie in die Perfusionskammer 4 eintritt. An die Perfusionskammer 4 schließt sich dann eine Abflußkammer 7 an, aus der eine Abflußleitung 8 zu einem Auffangbehälter 9 führt. Das Gehäuse 3 der Perfusionskammer 4 ist mit einer Abdeckung 10 überdacht und wird durch eine Heizung 11 auf gleichbleibender Temperatur entsprechend der mittleren Körpertemperatur von 37°C gehalten.

Die eigentliche Perfusionskammer 4 kann noch mit Agarose zumindest teilweise aufgefüllt sein.

Durch die Perfusionskammer 4 wird langsam eine Nährlösung, z.B. die im Handel unter der Bezeichnung Hams F12 erhältliche Lösung geführt. Diese Nährlösung wird durch eine Pumpe 12, z.B. eine peristaltische Pumpe transportiert, die in der Zuleitung 5 angeordnet ist und Nährlösung aus einem

Vorratsbehälter 13 ansaugt. Dieser Vorratsbehälter 13 befindet sich z.B. in einem Wasserbad 14 bei einer Temperatur von 4°C. Die zeitliche Transportmenge der peristaltischen Pumpe 12 ist sehr gering und in dem hier vorliegenden Fall für die Herstellung von Knorpelgewebe auf etwa ein Milliliter pro Stunde eingestellt. Damit lassen sich einige Trägerstrukturen - in der Zeichnung sind drei derartige Trägerstrukturen 1 in der Perfusionskammer 4 dargestellt - ausreichend ernähren, wobei diese Trägerstrukturen einen Querschnitt von maximal einer Daumennagelgröße aufweisen.

Die peristaltische Pumpe 12 wird durch einen Zeitgeber 15 intervallartig gesteuert, wobei die Intervalle je nach Größe der Trägerstrukturen und der Perfusionskammer einstellbar sind: In der Praxis werden die Pump- und Pausenintervalle sich im Minuten- bzw. Stundenbereich befinden. Gute Ergebnisse wurden bei Pump- und Pausenintervallen von jeweils ca. 30 Minuten erreicht.

Perfusionsapparaturen sind an sich bekannt. Sie dienen ansonsten dazu, Zellkulturen, die auf einer Membran angeheftet werden, mit kontinuierlichen Bedingungen zu züchten, und ersetzen damit die herkömmlichen Petri-Schalen. Die Membranen mit den aufgebrachten Zellkulturen können hierbei durch Schlitze in die Perfusionskammer eingesetzt werden.

Die durch die Perfusionsapparatur 2 geführte Nährlösung diffundiert durch den Mantel aus Agarose in die Trägerstruktur 1, so daß die darin aufgenommenen Zellen ernährt werden. Die Strömung der Nährlösung und die Intervallsteuerung sind so eingestellt, daß die für den Aufbau der interzellulären Matrix notwendigen Zellprodukte nicht weggeschwemmt werden, sondern an ihrem Platz verbleiben. Im Laufe der Zeit bildet sich die interzelluläre Matrix mit ihren Kollagenfasern zwischen den Zellen aus, so daß die Zellen aneinander gebunden werden. Die Trägerstruktur



und die Agarose können sich während dieses langdauernden Prozesses zumindest teilweise auflösen. Durch die Ausbildung der interzellulären Matrix bleibt jedoch die vorgegebene Form und damit auch die gewünschte Form des späteren Implantates erhalten.

Ist die interzelluläre Matrix ausreichend ausgebildet, was etwa ab 10 Tagen bis in einigen Wochen der Fall ist, wird die Trägerstruktur aus der Perfusionskammer herausgenommen und implantiert. Im Laufe der Zeit wird die Matrix weitergebildet, während die Trägerstruktur resorbiert wird.

Es konnte gezeigt werden, daß mit einem derartigen Verfahren tatsächlich die interzelluläre Matrix in vitro aufgebaut wird, was bis dato soweit bekannt noch nicht beobachtet wurde.

Es ist des weiteren möglich, sogenannte gewebsmorphogene Faktoren an das Vlies der Trägerstruktur anzulagern. Derartige morphogene Faktoren regen die Zellbildung und die Bildung der interzellulären Matrix und damit die Knorpelbildung an. Derartige Faktoren können entweder bereits in die Trägerstruktur während der Bildung der interzellulären Matrix in der Perfusionskammer oder nach der Implantation in die Trägerstruktur eingebracht werden. Eine elegante Lösung besteht darin, den gewebsmorphogenen Faktor direkt an das Vliesmaterial zu koppeln oder an einen Antikörper zu koppeln und das Vliesmaterial der Trägerstruktur mit Haptenen zu versehen, an die sich die Antikörper anlagern. Dadurch wirken diese Faktoren nur lokal im Bereich der Trägerstruktur.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere Knorpelzellen, wobei die Zellen auf einer resorbierbaren Trägerstruktur aufgebracht und anschließend gemeinsam mit dieser implantiert werden, gekennzeichnet durch folgende Merkmale:

es wird eine dreidimensionale, im wesentlichen formstabile entsprechend der gewünschten Form des Implantats vorgeformte Trägerstruktur mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen Volumen verwendet;

in den inneren Hohlraum der Trägerstruktur werden die Zellen eingebracht;

die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur wird mit einer Nährlösung zumindest so lange perfundiert, d.h. durchströmt, bis sich zumindest teilweise eine die Zellen aneinander bindende interzelluläre Matrix ausgebildet hat, wonach die Trägerstruktur implantiert werden kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur ein Vlies aus Polymerfasern, insbesondere Polyglykolen oder Polylactiden ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur, bevor die Zellen in diese eingebracht werden, mit Adhäsionsfaktoren, insbesondere Poly-L-Lysin, versehen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsionsfaktoren durch Lyophilisation auf die innere Oberfläche der Trägerstruktur aufgebracht werden.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der innere Hohlraum der Trägerstruktur so gestaltet und dimensioniert ist, daß die Nährlösung durch die Trägerstruktur diffundiert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einem Material, insbesondere Agarose, ummantelt wird, durch das die Nährlösung hindurchdiffundieren kann.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur mit den darin aufgenommenen Zellen intervallartig durchströmt wird, so daß sich an eine Perfusionsphase jeweils eine Pause anschließt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur mit den darin aufgenommenen Zellen zur Perfusion in eine Perfusionskammer eingesetzt wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in der Suspension mit dem Kulturmedium in die Trägerstruktur eingebracht werden, wobei zusätzlich die Suspension mit einem die Viskosität erhöhenden Stoff, vorzugsweise Agarose, versetzt wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß an die Trägerstruktur ein gewebsmorphogener Faktor angelagert wird, der die Zellbildung und die Bildung einer interzellulären Matrix unterstützt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der gewebsmorphogene Faktor an einen Antikörper gekoppelt wird, der sich an dem Material der Trägerstruktur, vorzugsweise an dort aufgebraachten Haptene anlagert.

## GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 15. August 1994 (15.08.94) eingegangen;  
ursprüngliche Ansprüche 1-11 durch neue Ansprüche 1-13 ersetzt (3 Seiten)]

1. Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere Knorpelzellen, wobei die Zellen auf eine im implantierten Zustand resorbierbare Trägerstruktur aufgebracht und anschließend gemeinsam mit dieser implantiert werden, gekennzeichnet durch folgende Merkmale:

es wird eine dreidimensionale, im wesentlichen formstabile und entsprechend der gewünschten Form des Implantats vorgeformte Trägerstruktur mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen Volumen verwendet;

in den inneren Hohlraum der Trägerstruktur werden die Zellen eingebracht;

die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur wird mit einer Hülle aus einem Material ummantelt, das so gewählt ist, daß eine Nährlösung durch dieses Material in das Innere der Trägerstruktur strömen kann;

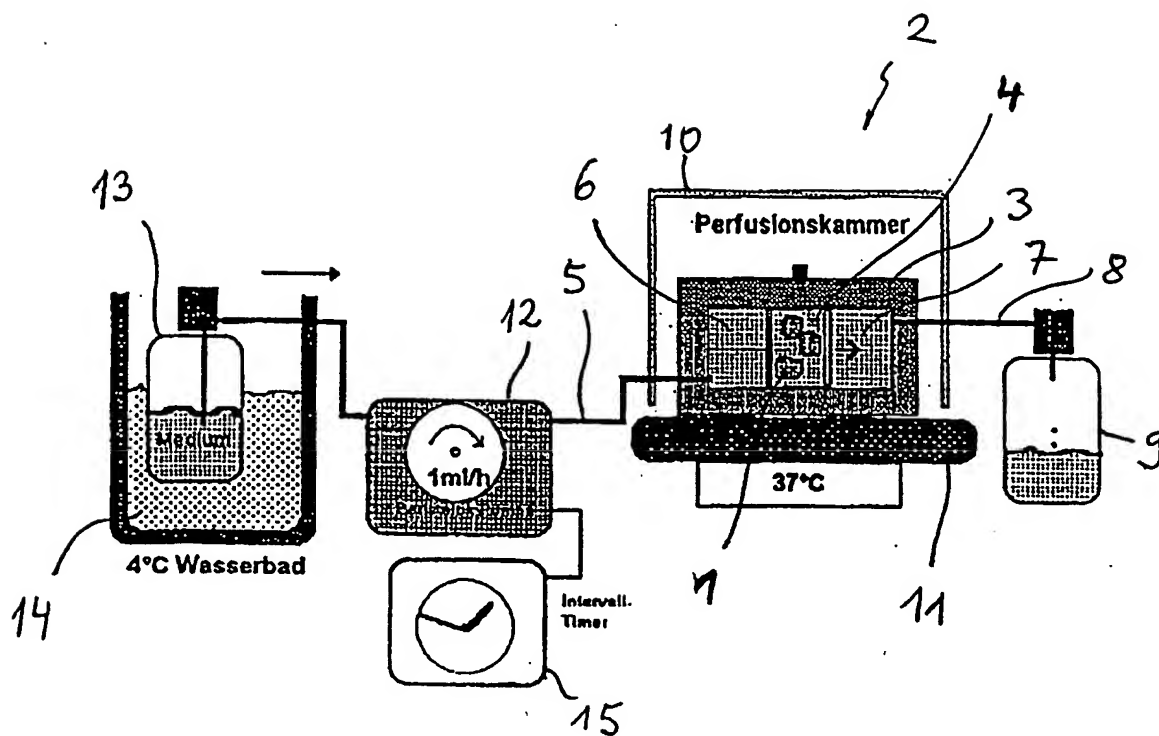
die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur wird durch die Hülle hindurch mit einer Nährlösung zumindest solange perfundiert, d.h. durchströmt, bis sich zumindest teilweise eine die Zellen aneinander bindende interzelluläre Matrix ausgebildet hat, wonach die Trägerstruktur implantiert werden kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Material der Hülle so gewählt ist, daß für die Nährlösung

im wesentlichen nur eine Diffusion in das Innere der Trägerstruktur zugelassen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Material der Hülle so gewählt ist, daß die für den Aufbau der interzellulären Matrix notwendigen Zellenprodukte, insbesondere Kollagene und Proteoglycane, durch die Hülle im Inneren der Trägerstruktur zurückgehalten werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Material der Hülle Agarose ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur ein Vlies aus Polymerfasern, insbesondere Polyglykolen oder Polylactiden ist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur, bevor die Zellen in diese eingebracht werden, mit Adhäsionsfaktoren, insbesondere Poly-L-Lysin, versehen wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsionsfaktoren durch Lyophilisation auf die innere Oberfläche der Trägerstruktur aufgebracht werden.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der innere Hohlraum der Trägerstruktur so gestaltet und dimensioniert ist, daß die Nährlösung durch die Trägerstruktur diffundiert.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur mit den darin aufgenommenen Zellen intervallartig durchströmt wird, so daß sich an eine Perfusionsphase jeweils eine Pause anschließt.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur mit den darin aufgenommenen Zellen zur Perfusion in eine Perfusionskammer eingesetzt wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in einer Suspension mit dem Kulturmedium in die Trägerstruktur eingebracht werden, wobei zusätzlich die Suspension mit einem die Viskosität erhöhenden Stoff, vorzugsweise Agarose, versetzt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß an die Trägerstruktur ein gewebsmorphogener Faktor angelagert wird, der die Zellbildung und die Bildung einer interzellulären Matrix unterstützt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der gewebsmorphogene Faktor an einen Antikörper gekoppelt wird, der sich an dem Material der Trägerstruktur, vorzugsweise an dort aufgebrauchten Haptinen anlagert.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 94/00235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 A61L27/00 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 A61L C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,88 03785 (J. VACANTI) 2 June 1988 see claims see page 11, line 16 - page 13, line 1 see page 22, line 18 - line 25 see page 23, line 22 - line 32 see page 49, line 1 - line 5 ---	1-11
Y	WO,A,90 12603 (J. VACANTI) 1 November 1990 see claims; examples ---	1-11
Y	EP,A,0 282 746 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 21 September 1988 see column 4, line 3 - line 28; claims ---	1-11
A	EP,A,0 470 681 (W.R. GRACE & CO.) 12 February 1992 see column 7, line 32 - line 38 --- -/--	3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*I\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 June 1994

Date of mailing of the international search report

15. 06. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Cousins-Van Steen, G



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 94/00235

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 846 835 (D. GRANDE) 11 July 1989 ---	
A	WO,A,85 04185 (A. CAPLAN) 26 September 1985 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 94/00235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8803785	02-06-88	EP-A- 0299010 JP-T- 1501362 US-A- 5041138	18-01-89 18-05-89 20-08-91
WO-A-9012603	01-11-90	US-A- 5041138 AU-B- 635025 AU-A- 5556890 CA-A- 2051663 EP-A- 0469070 JP-B- 6006155 JP-T- 4505717	20-08-91 11-03-93 16-11-90 18-10-90 05-02-92 26-01-94 08-10-92
EP-A-0282746	21-09-88	JP-A- 1010983	13-01-89
EP-A-0470681	12-02-92	JP-A- 5168470 CA-A- 2048746	02-07-93 09-02-92
US-A-4846835	11-07-89	NONE	
WO-A-8504185	26-09-85	US-A- 4609551 AU-A- 4153985 EP-A- 0175762	02-09-86 11-10-85 02-04-86

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00235

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 5 A61L27/00 C12N5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 5 A61L C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,88 03785 (J. VACANTI) 2. Juni 1988 siehe Ansprüche siehe Seite 11, Zeile 16 - Seite 13, Zeile 1 siehe Seite 22, Zeile 18 - Zeile 25 siehe Seite 23, Zeile 22 - Zeile 32 siehe Seite 49, Zeile 1 - Zeile 5 ---	1-11
Y	WO,A,90 12603 (J. VACANTI) 1. November 1990 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1-11
Y	EP,A,0 282 746 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 21. September 1988 siehe Spalte 4, Zeile 3 - Zeile 28; Ansprüche --- -/-	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Juni 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15. 06. 94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cousins-Van Steen, G

## C.(Fortsetzung) ALS WESSENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 470 681 (W.R. GRACE & CO.) 12. Februar 1992 siehe Spalte 7, Zeile 32 - Zeile 38 ---	3
A	US,A,4 846 835 (D. GRANDE) 11. Juli 1989 ---	
A	WO,A,85 04185 (A. CAPLAN) 26. September 1985 -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00235

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-8803785	02-06-88	EP-A- 0299010 JP-T- 1501362 US-A- 5041138	18-01-89 18-05-89 20-08-91
WO-A-9012603	01-11-90	US-A- 5041138 AU-B- 635025 AU-A- 5556890 CA-A- 2051663 EP-A- 0469070 JP-B- 6006155 JP-T- 4505717	20-08-91 11-03-93 16-11-90 18-10-90 05-02-92 26-01-94 08-10-92
EP-A-0282746	21-09-88	JP-A- 1010983	13-01-89
EP-A-0470681	12-02-92	JP-A- 5168470 CA-A- 2048746	02-07-93 09-02-92
US-A-4846835	11-07-89	KEINE	
WO-A-8504185	26-09-85	US-A- 4609551 AU-A- 4153985 EP-A- 0175762	02-09-86 11-10-85 02-04-86

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**